

## Aplicaciones de la Espectroscopía Vibracional al Estudio de Metallo-biomoléculas y Metallo-fármacos

Enrique J. Baran  
 Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR)  
 Facultad de Ciencias Exactas, UNLP  
 C. Correo 962, 1900 La Plata  
 Argentina

(Email: baran@quimica.unlp.edu.ar)

## Introducción general

- Observando objetos de tamaño ordinario, inmediatamente obtenemos información acerca de su forma, dimensiones, tamaño, simetría, etc.
- De la misma manera, los métodos espectroscópicos nos permiten "ver" a las moléculas. En este caso, estudiando las longitudes de onda que ellas absorben.

- Para que ocurra una absorción de energía, la energía de la radiación debe ser idéntica a la diferencia de energía entre dos niveles de energía cuantizados, correspondientes a dos estados diferentes de la molécula.
- En general:  $\Delta E = h \cdot c / \lambda = h \cdot c \cdot \bar{\nu}$

La radiación está caracterizada por su longitud de onda,  $\lambda$ , y de acuerdo a su valor estaremos en diferentes zonas del espectro electromagnético. Y, en cada región, podremos excitar diferentes energías moleculares.

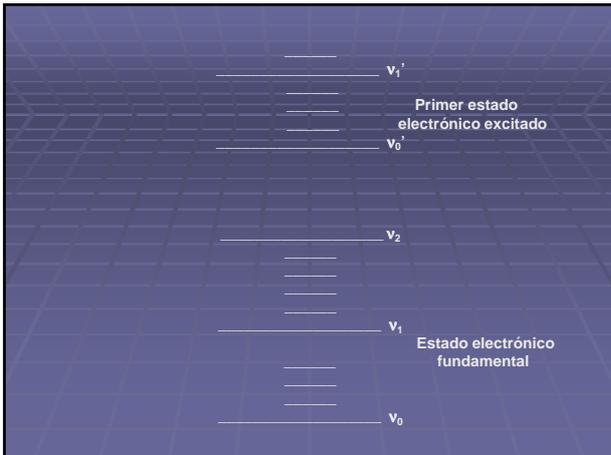
## Aproximación de Born-Oppenheimer

- En el tratamiento teórico de espectros moleculares normalmente utilizamos esta aproximación que establece:
- LA ENERGÍA TOTAL DE CUALQUIER SISTEMA PUEDE SER CONSIDERADA COMO LA SUMATORIA DE TRES ENERGÍAS INDEPENDIENTES

$$\Psi_T = \Psi_{\text{elec}} \cdot \Psi_{\text{vibr}} \cdot \Psi_{\text{rot}}$$

> 14.000	14.000 a 4000	4000 a 400	400 a 4	< 4
VISIBLE UV & RX	IR CERCANO	IR MEDIO	IR LEJANO	MICRO-ONDAS RADIO
← MAYORES Nros. DE ONDA			→ MENORES Nros. DE ONDA	
MAYOR FRECUENCIA			MENOR FRECUENCIA	
MAYOR ENERGÍA			MENOR ENERGÍA	
MENOR LONGITUD DE ONDA			MAYOR LONGITUD DE ONDA	

$$\Delta E = h \cdot c / \lambda = h \cdot c \cdot \bar{\nu}$$



## Energía molecular

- Cada partícula en movimiento posee tres grados de libertad traslacional. La energía cinética total de cada molécula es por lo tanto  $3/2kT$ .
- Cada molécula posee tres grados de libertad rotacional (excepto las lineales, que sólo tienen dos).
- Cuántos grados de libertad vibracional tiene una molécula constituida por  $n$  átomos?

- Cada sistema posee  $3n$  grados de libertad. De éstos debemos restar 3 para las traslaciones y 3 (ó 2) para las rotaciones. Por lo tanto los grados de libertad vibracional son  $3n-6$  (ó  $3n-5$ ).
- EJEMPLOS:
  - $H_2O$  tiene tres modos normales de vibración.
  - $CO_2$  tiene cuatro modos normales de vibración.

## Espectroscopia IR

- La espectroscopia IR estudia la interacción de radiación IR con la materia.
- En estas mediciones se obtiene un ESPECTRO, que es un gráfico que representa la intensidad de las bandas de absorción en función de la energía de la radiación.

## VENTAS y DESVENTAJAS

- **VENTAJAS:**
  - Es una técnica universal, aplicable a gases, líquidos y sólidos.
  - Suministra una gran cantidad de información (posición, forma, ancho de banda).
  - Técnica rápida y fácil de aplicar.
  - Aplicable a cantidades pequeñas de muestra.
  - Permite determinar trazas ( $\sim 10^{-6}$  g).
  - Costos de instrumental relativamente bajos.

- **DESVENTAJAS:**
  - No aplicable a especies monoatómicas.
  - No aplicable a moléculas diatómicas homonucleares (O-O), (N-N), etc.).
  - Análisis espectral de mezclas es muchas veces muy complicado.
  - Es dificultoso el estudio de soluciones acuosas.

## Origen del espectro IR

- Para que una molécula pueda absorber radiación IR la molécula deberá tener una vibración durante la cual ocurra un cambio en su momento dipolar, o sea:

$$\partial\mu/\partial x \neq 0$$

(y la intensidad de la banda de absorción depende de la magnitud  $(\partial\mu/\partial x)^2$ )

## Espectroscopía Raman

- Durante un experimento IR las moléculas absorben luz. En un experimento Raman la luz es dispersada inelásticamente.
- El vector eléctrico de la radiación interactúa con la molécula induciendo un dipolo eléctrico:  $\mu = \alpha E$ .
- La polarizabilidad,  $\alpha$ , depende de la distribución electrónica y cambia durante la vibración.

## Origen del espectro Raman

- Para que tenga lugar una dispersión Raman:

$$\partial\alpha/\partial Q_i \neq 0$$

- Esto significa que los espectros de IR y Raman tienen un origen físico diferente (diferentes reglas de selección).

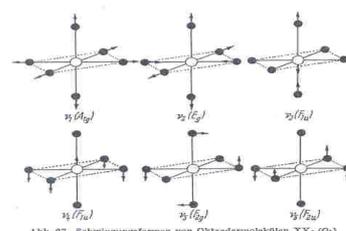
## VENTAJAS:

- Se pueden medir moléculas homonucleares.
- Se puede trabajar en soluciones acuosas.
- Se pueden identificar fácilmente los modos totalmente simétricos (factor de depolarización).
- La técnica de resonancia Raman es particularmente útil para el estudio de biomoléculas y especies relacionadas.

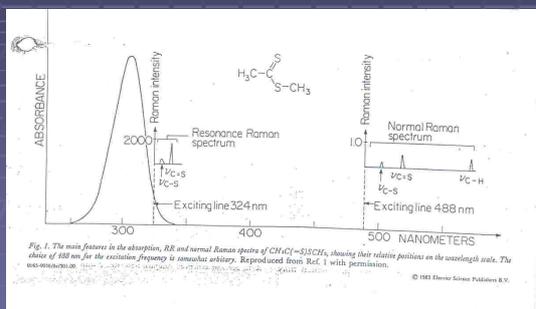
## Principio de Exclusión

En una molécula centrosimétrica ninguna vibración puede ser activa simultáneamente en IR y Raman.

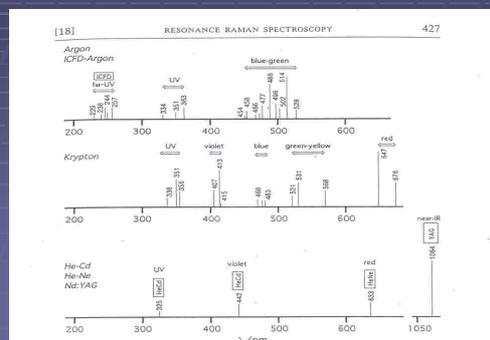
## Ejemplo (molécula $O_h$ )



## Resonancia Raman



## Líneas láser más usuales



## Criterios de asignación

- Argumentos basados en la simetría molecular (Teoría de grupos).
- Identificación de frecuencias características de grupos funcionales.
- Utilización de atlas de espectros y comparaciones con especies relacionadas.
- Análisis por coordenadas normales (método de las matrices F y G de Wilson). Cálculo de constantes de fuerza y distribución de energía potencial.

## Espectros de cristales

- Información cristalográfica completa, si está disponible. Sino, búsqueda de materiales isoestructurales.
- Análisis por simetría de sitios: correlaciona la simetría del ion "libre" con su simetría real ("simetría del sitio") en el retículo cristalino.
- Análisis por grupo factor: correlaciona la simetría del sitio con la del grupo factor. Este tratamiento permite identificar las interacciones entre todos los vibradores presentes en la celda unitaria.

## ALGUNAS APLICACIONES

al estudio de  
metalo-fármacos  
y  
metalo-biomoléculas

## $\text{CaCO}_3$ : Calcita/Aragonita

- El anión carbonato "libre",  $\text{CO}_3^{2-}$ , es un ion planar de simetría puntual  $D_{3h}$
- Tiene 6 vibraciones fundamentales ( $3n-6 = 12-6 = 6$ ):
  - $\nu_1(A_1')$ , estiramiento simétrico [Ra]
  - $\nu_2(A_2'')$ , deformación fuera del plano [IR]
  - $\nu_3(E')$ , estiramiento antisimétrico [Ra,IR]
  - $\nu_4(E')$ , deformación antisimétrica [Ra,IR]

## Calcita

- **Datos cristalográficos:**
- Grupo espacial:  $D_{3d}^6$  y  $Z = 2$
- **Correlaciones:**
- $D_{3h} \rightarrow D_3 \rightarrow D_{3d}$
- $\nu_1(A_1') \rightarrow A_1(Ra) \rightarrow A_{1g}(Ra)+A_{1u}$
- $\nu_2(A_2'') \rightarrow A_2(IR) \rightarrow A_{2u}(IR)+A_{2g}$
- $\nu_3, \nu_4(E') \rightarrow E(Ra, IR) \rightarrow E_g(Ra)+E_u(IR)$

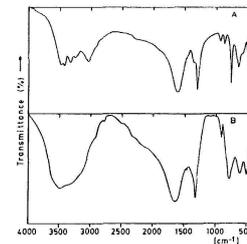
## Aragonita

- **Datos cristalográficos:**
- Grupo espacial:  $D_{2h}^{16}$  y  $Z = 4$
- **Correlaciones:**
- $D_{3h} \rightarrow C_s \rightarrow D_{2h}$
- $\nu_1(A_1') \rightarrow A' \rightarrow A_g+B_{2g}+B_{1u}+B_{3u}$
- $\nu_2(A_2'') \rightarrow A' \rightarrow A_g+B_{2g}+B_{1u}+B_{3u}$
- $\nu_3, \nu_4(E') \rightarrow A'+A'' \rightarrow A_g+B_{2g}+B_{1u}+B_{3u} + B_{1g}+B_{3g}+B_{2u}+A_u$

## Oxalatos de calcio en plantas

- $CaC_2O_4 \cdot H_2O$  (*whewellita*), monoclinico
- $CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$  (*weddellita*), ortorómbico
- $CaC_2O_4 \cdot 3H_2O$ , triclinico
- *Whewellita* es la forma termodinámicamente más estable.

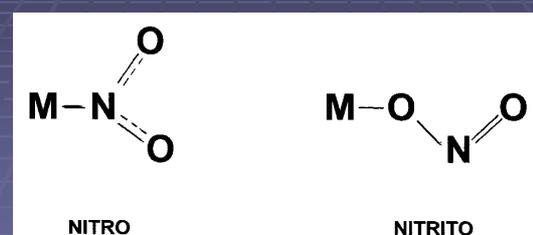
## A: *Puna clavarioides* B: *Pyrhocactus straussianus*



## Relaciones genéticas en cactáceas

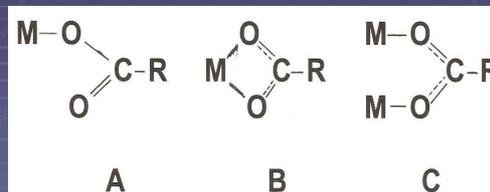
- *Opuntioideae* siempre biomineralizan whewellita.
- *Cereoideae* siempre biomineralizan weddellita.
- *Pereskias* (ejemplos de cactáceas "ancestrales") también biomineralizan whewellita, al igual que diversas suculentas no-cactáceas.

## Isómeros de coordinación



- Como en los NITRO los dos enlaces N-O son equivalentes, aparecen vibraciones  $\nu_{as}$  y  $\nu_s$  (1400 y 1330  $\text{cm}^{-1}$  aproxim.).
- En cambio, en los NITRITO hay un enlace N-O (1100  $\text{cm}^{-1}$ ) y uno N=O (1480  $\text{cm}^{-1}$ ).
- Además los NITRO tienen una  $\rho_w$  típica cerca de 600  $\text{cm}^{-1}$  de mediana intensidad en IR, y ausente en los NITRITO.

## Vibraciones de carboxilato



## Valores típicos

$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C-O})$	$\Delta$	
1560	1416	144	$\text{CH}_3\text{COO}^-$ libre
1600	1320	280	monodentado
1520	1450	70	bidentado
1580	1440	140	punteado

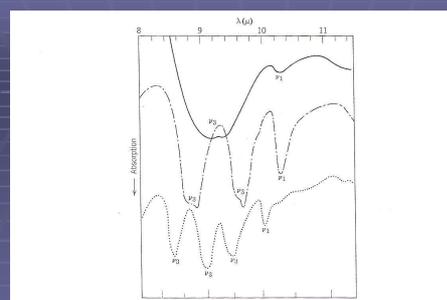


Fig. III-19. Infrared spectra of  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (solid line);  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{SO}_4)]\text{Br}$  (dot-dash line); and  $[\text{NH}_3]_4\text{Co}(\text{NH}_3)_2(\text{NO}_3)_2(\text{SO}_4)$  (dotted line).<sup>258</sup>

## Vibraciones metal-ligando

- Muchas veces resultan difíciles de localizar.
- **ALGUNOS VALORES TÍPICOS:**
  - Enlaces M-N en aminas: 300-500  $\text{cm}^{-1}$
  - Enlaces M-N en complejos de py: 220-280  $\text{cm}^{-1}$
  - Enlaces M-O en acuo complejos: 370-500  $\text{cm}^{-1}$
  - Enlaces M-O en oxalato complejos: ~ 500  $\text{cm}^{-1}$
  - Enlaces M-C en ciano-complejos: 300-400  $\text{cm}^{-1}$

## Sustitución isotópica

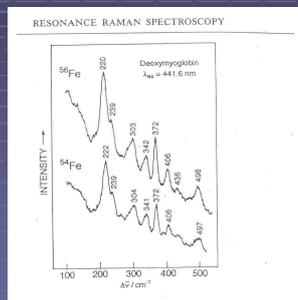
- Es muy importante para la asignación en zonas de bajas frecuencias.
- Por ej., utilizando ligandos con  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$
- Isótopos de metales o de halógenos
- En el caso de los compuestos de boro la composición isotópica normal es muy favorable para este tipo de medidas:  $^{10}\text{B}$  (20%),  $^{11}\text{B}$  (80%)

### H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O

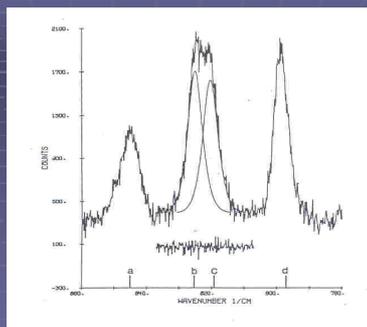
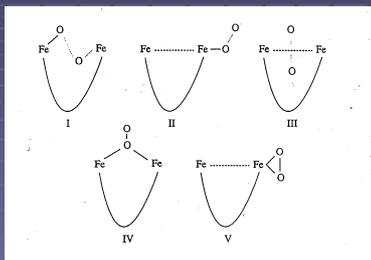
- Esta sustitución es muy favorable. En términos de la regla de Teller-Redlich:
- $\nu(H)/\nu(D) = \sqrt{\mu_H/\mu_D} \sim \sqrt{2} = 1,41$

MgC <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	parc.deuterada	$\nu_H/\nu_D$
3380 vs	2553/2476	1,32/1,37
ca.1620	1189	1,36
830	821	1,01
690	470	1,47
501	502	

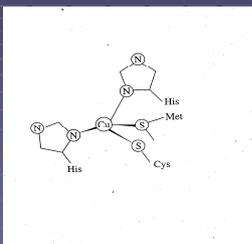
### $\nu(\text{Fe-N}_{\text{his}})$



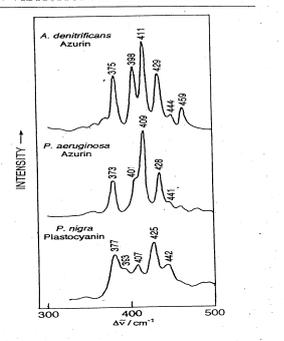
### Estructura hemeritina oxigenada



### Proteínas "azules"



### VIBRATIONAL SPECTROSCOPY



### SERS: Surface-enhanced Raman scattering

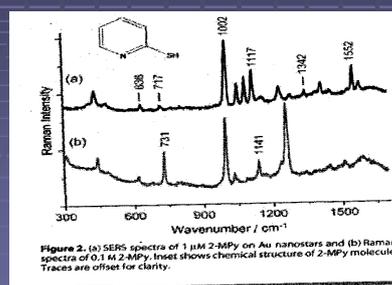
- Es especialmente útil para el estudio de soluciones muy diluidas.
- Generalmente, se obtienen fuertes intensificaciones de la señal espectral (en ciertos casos en un factor de hasta  $10^7$ ).

- La adsorción se efectúa sobre superficies metálicas (Au, Ag, Cu), en suspensiones coloidales, o sobre nanopartículas de diverso tipo.
- La teoría todavía está en desarrollo.
- Los mecanismos de exaltación se dividen, usualmente, en efectos electromagnéticos y en efectos químicos.

### SERS: Mecanismos

- El factor electromagnético de exaltación proviene de la excitación de resonancias electromagnéticas en la nano-estructura metálica.
- El factor de exaltación química proviene de un tipo de resonancia Raman mediada por electrones del metal, *via* un estado de transferencia de carga que tiene lugar en los así llamados *sitios activos*.

### Ejemplo: 2-mercaptopiridina (sobre nanopartículas deAu)



### BIBLIOGRAFÍA

- R. Chang, *Principios Básicos de Espectroscopía*, Editorial AC, Madrid 1977.
- J.R. Wright, W.A. Hendrickson & S. Osaki, *Physical Methods for Inorganic Biochemistry*, Plenum Press, New York, 1986.
- J.R. Ferraro, K. Nakamoto & C.W. Brown, *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd. Edit., Elsevier, New York, 2003.
- K. Sauer (Edit.), *Methods in Enzymology*, Vol. 246: *Biochemical Spectroscopy*, Academic Press, San Diego, 1995.

### Espectroscopía Inorgánica

- K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th. Edit., J. Wiley, New York, 2009.
- S.D. Ross, *Inorganic Infrared and Raman Spectra*, McGraw-Hill, London, 1972.
- H. Siebert, *Anwendungen der Schwingungsspektroskopie in der Anorganischen Chemie*, Springer, Berlin, 1966.

### *Otros textos importantes*

- B. Smith, *Infrared Spectral Interpretation*, CRC-Press, Boca Raton, 1999.
- D. Lin-Vien, N.B. Colthup, W.G. Fateley & J.G. Grasselli, *Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, Boston, 1991.
- F.S. Parker, *IR-Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicine*, Adam Hilger, London, 1971.